

29.10.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

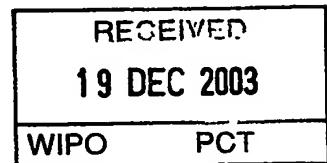
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年10月29日

出願番号
Application Number: 特願2002-314078

[ST. 10/C]: [JP2002-314078]

出願人
Applicant(s): 近藤 玄

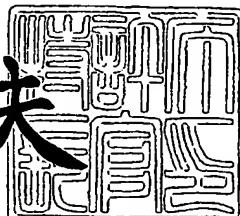


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP02405-YS
【提出日】 平成14年10月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 38/17
【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤
【請求項の数】 3
【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地
【氏名】 近藤 玄
【特許出願人】
【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地
【氏名又は名称】 近藤 玄
【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【電話番号】 03-5454-7191
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009911
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤。

【請求項2】 プリオン性疾患の予防または治療用である請求項1の薬剤。

【請求項3】 細菌感染疾患の予防または治療用である請求項1の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、アンギオテンシン変換酵素を含有する薬剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とし、プリオン性疾患や細菌感染疾患等の予防または治療に有用な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アンギオテンシン変換酵素 [angiotensin-converting enzyme: ACE。酵素学的にはジペプトイジルカルボキシペプチダーゼ (EC 3.4.15.1)] は、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン血圧制御系の一員で、アンギオテンシンIを活性化型のアンギオテンシンIIに変換するとともに、ブラディキニンを分解不活性化することによって様々な生理活性の変化 (例えば、血圧上昇) を生じさせることが知られている (非特許文献1)。このため、ACE阻害を薬理作用とする薬剤 (例えば、血圧降下剤) やACE阻害剤等の発明が数多く存在する (例えば、特許文献1-4)。

【0003】

一方、細胞の表面を構成する細胞膜はタンパク質と脂質を主成分とし、エネルギーの生産、刺激の伝達、細胞間相互作用、分泌などの多彩な生命機能を営む場である。GPIアンカー型タンパク質はGPIアンカーを介して細胞膜に結合するその

主要な構成成分であり、上記の生命機能維持の一翼を担っている重要な分子群である。しかし他方で、細胞膜のGPIアンカーには正常型プリオントンパク質が結合しており、この正常型プリオンに異常型プリオンが結合するとクロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Straussele症候群、クルー病等のいわゆる「プリオン性疾患」の原因となる。また、GPIアンカーに結合するリポポリサッカライド（LPS）受容体CD14には菌体毒素LPSが結合し、細胞障害の原因となっている。

【0004】

従って、プリオン性疾患や細菌感染等に対する症状の緩和や治療においては、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることが有効である。しかしながら、細胞表面における有効なGPIアンカー型タンパク質遊離活性物質はこれまで知られていなかった。

【0005】

なお、ACEはアンギオテンシンⅠおよびプラティキニン以外の基質、例えばエンケファリン、ならびにヘプタペプチドおよびオクタペプチドのエンケファリン前駆体を切断する。また、トリデカペプチド、ニューロテンシンをジペプチドおよびウンデカペプチドに加水分解し、さらにはサブスタンスPを切断不活性化することが知られている（非特許文献2）。しかしながら、ACEがGPIアンカー型タンパク質を細胞表面からGPIアンカータンパク質から切断遊離することは、従来、全く知られていない。

【0006】

【特許文献1】

特開平10-036391号公報

【特許文献2】

特開2001-064299号公報

【特許文献3】

特開2001-233789号公報

【特許文献4】

特開2002-138100号公報

【非特許文献1】

Hooper et al., Int. J. Biochem. 23:641-647, 1991

【非特許文献2】

Skidgel et al., Neuropeptides and Their Prptidases, Turner AJ Ed.,
Chichester, UK, 1989

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

この出願の発明者は、GPIアンカー型タンパク質遊離活性を有する物質を探索し、この物質がACEであることを見出した。

【0008】

この発明は、発明者による以上のとおりの新規な知見に基づくものであり、有害なGPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって各種疾患を予防または治療するための新規薬剤を提供することを課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤を提供する。

【0010】

この薬剤は、好ましくは、プリオントン性疾患または細菌感染疾患の予防または治療用としての薬剤である。

【0011】

この発明において、「GPIアンカー型タンパク質」とは、細胞膜のGPIアンカーに結合するタンパク質であり、例えば、プリオントン性疾患に関係する正常型または異常型プリオントン、菌体毒素LPSの受容体CD14等である。

【0012】

「GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させる」とは、細胞膜のGPIアンカーに結合しているGPIアンカー型タンパク質をGPIアンカーから切断分離させて、不活性化させることを意味する。これによって、例えばGPIアンカー型タンパク質である正常型プリオントンが細胞膜から遊離され、正常型プリオントンに結合してブ

リオン性疾患の原因となる異常型プリオンが細胞膜に結合することが防止される。また、菌体毒素LPSの受容体CD14が細胞膜から遊離されるため、膜型CD14-LPS複合体の形成が阻害され、LPSによる細胞障害や炎症反応の拡大が防止または改善される。

【0013】

「プリオン性疾患」は、例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-St raussele症候群、クルー病等である。

【0014】

「細菌感染疾患」は、例えば、グラム陰性菌（大腸菌、インフルエンザ桿菌、サルモネラ菌、髄膜炎菌、緑膿菌等）による感染症であり、またそれらの細胞毒によるエンドトキシンショック等の炎症性疾患等である。

【0015】

なお、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製はRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995) 等に記載されている。

【0016】

以下、発明の実施形態を詳しく説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】

この発明において使用するACEは、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（体細胞や精巣細胞）から公知の方法によって単離することができる（体細胞型ACE-S、精巣型ACE-T）。また、市販品（例えば、ウサギ肺由来のACE-S：Sigma A-6778等）や、特表2002-525108号公報に開示されているアンギオテンシン変換酵素相同物を使用することもできる。さらには、そのアミノ酸配列（ヒトACE-S：Gen

Bank/J04144、ヒトACE-T:GenBank/M26657) 等に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、ACEをコードするポリヌクレオチドを *in vitro* 転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによって、組換えACEとして取得することができる。ポリヌクレオチド（例えばACE cDNA）は前記GenBankデータベースや特表2002-525108号公報の塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存のcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCR法等の公知の方法により取得することができる。

【0018】

例えば組換えACEを *in vitro* 転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKAl、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

【0019】

組換えACEを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のDNA断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【0020】

また組換えACEを真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKAl、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、p

RS、pcDNA3、pMSG、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

【0021】

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

【0022】

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換えACEを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0023】

この発明の薬剤は、実施的にACE単独であってもよいが、疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて、薬剤的に許容される担体と混合して調製するが好ましい。すなわち、この発明の薬剤は、非経口的または経口的な投与に適した剤型となるような担体と混合することができる。

【0024】

非経口投与は、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注、直腸投与等であり、例えば注射剤としての製剤化する場合の担体としては、滅菌水、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物等を使用することができる。また緩衝剤pH調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、P-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の製薬補助剤を含有することもできる。このように製剤化した薬剤は、細菌保持フィルターを通す濾過、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調

製するようにしてもよい。

【0025】

経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、または懸濁剤やシロップ剤のような経口液体調製物等）に製剤化する。担体としては、常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、シュガー、コーンスターチ、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスターチ、カルボキシメチルセルロース等）、湿潤剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を使用することができる。ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加することもできる。また錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液またはドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤、例えば保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含していてもよい。

【0026】

ACEの含有量は対象疾患やその投与形態に応じて適宜とすることができるが、通常は5~100% (w/w)、好ましくは10~60% (w/w) の範囲とすることができる。

【0027】

この発明の薬剤の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ACE量として100~200mg/kg/day程度とすることができる。なお、ACEは人体に存在するタンパク質であり、その安全性については問題がない。

【0028】

以下、ACEのGPIアンカー型タンパク質遊離活性について試験した結果について説明する。

1. 材料と方法

1.1. 組織学的分析

GPIアンカーGFP (EGFP-GPI) 遺伝子導入マウス (Kondoh, G. et al. FEBS let t. 458, 299-303, 1999) をフェノバルビタールにより麻酔し、左心室経由で4%

W/V) パラホルムアルデヒド-PBSを灌流させることにより固定した。切除した組織を4%パラホルムアルデヒド-PBS中で再度固定し、20%スクロース-PBS中で4℃で48時間にわたりインキュベートした。次に組織断片をTissue-Tek O.C.T化合物 (Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に埋め込み、ドライアイスで急速冷凍し、低温槽上で5-10 μm厚に切断した。標本の調査は、GFP特異的フィルタを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) を用いて行った。

1.2. EGFP-GPIのイムノプロッティング

Complete TMプロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 存在下、氷冷状態のTNE溶液 (10mM Tris-HCl pH7.8、1mM EDTA、150mM NaCl) 中で細胞と組織をホモジナイズした。ホモジネートは100,000×gで遠心分離し、上清を収集した（水溶性分画）。沈殿はTNE緩衝液中で洗浄し、次に1% TritonX-114 (Nacalai tasque, Kyoto, Japan) -TNE溶液中、Complete TMプロテアーゼ阻害剤の存在下でホモジナイズを行い、100,000×gで遠心分離し、上清を収集した（界面活性剤可溶性分画）。各組織の両方の分画をSDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に電気泳動的に転写し、抗GFPウサギポリクローナル抗体 (MBL, Nagoya, Japan) によるプローブ処理を行い、抗ウサギIgGを結合したECLシステム (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) を用いて染色の検出を行った。

1.3. PLAP変換アッセイ

非イオン化界面活性剤のTritonX-114が、37℃の条件で水溶性分子と界面活性剤可溶性の疎水性分子を分配する性質を利用した。PLAP変換アッセイを用いて、精製途中におけるGPIアンカータンパク質遊離活性のモニタリングを行った。PLAPは、COS7細胞中でcDNAを発現させて緩衝液 (20mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1% TritonX-114、Complete TMプロテアーゼ阻害剤) により抽出することにより調製し、37℃で分配した後で界面活性剤可溶性の相を収集した。次にDEAE-セルロース陰イオン交換液体クロマトグラフィー (LC) によりPLAPを部分精製した。界面活性剤可溶性のPLAPタンパク質を基質に用いてアッセイを行った。リン脂質部分を切断した場合には、PLAPはTritonX-114分画に界面活性剤可溶性の相から水溶性の相に移動し、PLAPの酵素活性は水溶相中で検出可能である。PLAP活性の測定は、アルカリホスファターゼ検出キット (Nacalai tasque, Kyoto) を用いて

製造元のプロトコルに従って行った。変換反応は、100mM Tris pH7.5、5mM CaCl₂、150mM NaClおよび0.1UのPLAPの条件で、90分にわたり37℃で実施した。反応停止はTritonX-114を最終濃度2%となるように添加することで行い、試料を25℃で微小遠心分離した。水溶相を収集し、PLAP活性を測定した。またこれはポリクローナル抗-PLAP抗体を用いたイムノプロッティングにも用いた (Biomedica, Foster City, USA)。

1.4. GPIアンカータンパク質遊離活性物質の精製

成熟したICRマウスの精巣500個を莢から出し、カミソリを用いて~1mm³の断片に切断した。生殖細胞の単離はピペット吸引の反復により行った。軽い遠心により輸精管を除去した後、上清を収集し、1500×gで遠心分離することによりさらに沈降させた。沈殿は10倍量の緩衝液 (3mM Tris pH7.4、2mM MgCl₂、1mM EDTA、0.25Mスクロース、およびComplete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で破碎および超音波処理を行い、ホモジネートを100,000×gで1時間にわたり遠心分離した。その沈殿を10倍量の緩衝液 (20mM Tris pH8.0、1% TritonX-100、およびComplete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で可溶化した。溶解産物は超遠心 (100,000×g) で1時間にわたり分離を行い、上清を収集した。この試料を以下の連続液体クロマトグラフィーにより精製した。

- (1) DEAE-セルロース (Seikagakukogyo, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM~500mM NaCl勾配) で溶出。
- (2) フェニルセファロース-セルロースCL-4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) : 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100) で溶出。
- (3) ConA-セファロース4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、150mM NaCl、500mM methyl- α -D-mannopyranosid (Seikagakukogyo, Tokyo)) で溶出。
- (4) TSKゲル3000SW (Tosoh, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、300mM NaCl) で溶出。

1.5. プロテオミクス分析

精製ペプチドをSDS-PAGEにより分離し、リシリエンドペプチダーゼを用いて消化し、Q-Tof2 LC-MS/MS (Micromass, UK) に供した。得られたシグナルに対して

Mascot検索を行った。

1.6. 細胞培養とトランスフェクション

F9、HeLaおよびCOS7細胞を、10% FCSを加えたDMEM培地で培養した。DNAトランスフェクションにはリポフェクトアミン試薬 (Life Technologies, Rockville, USA) を製造元のプロトコルに従って使用した。

1.7. ACE試料

ACE cDNAを、マウス精巣cDNAをテンプレートとして、'5-TGAATTCCACCATGGGCCA AGGTTGGGCTACTCCAGG-'3 (配列番号1) および'5-GAATTCTGTCACTTATCATCATCATCCTT ATAATCCTGCTGTGGCTCCAGGTACAGGC-'3 (配列番号2) のプライマーセットを用いて RT-PCRにより調製した。このPCR産物は、FLAGを付加した可溶性精巣ACEのアイソフォームをコードしている。このACE cDNAをトランスフェクションしたCOS7細胞の培養上清を収集し、組換えACEを抗-FLAG M2-アガロースアフィニティカラム (Sigma, St. Louis) を用いて精製した。また、ウサギ肺由来ACEの体細胞アイソフォーム (ACE-S) (Sigma A-6778) と、製造業者の支持する活性単位を使用した。

1.8. FACS分析

0.02% EDTA/PBSを用いて細胞を培養皿から剥離させ、1% BSAを含むHank's調整塩溶液に数回浸した。懸濁した細胞を、適切な時点で10 μ g/mlのフィリピン (filipin) /PBS (Sigma, St. Louis) を用いて0°Cで1時間にわたり処理した。PBSに浸した後、細胞をPBS稀釀化ACEまたはPI-PLC (GLYKO, Novato, USA) と共に、カプトプリル (Sigma, St. Louis) の存在下または非存在下の条件で、37°Cで1時間にわたり処理を行った。次に細胞を1% BSAを含むPBSに繰り返し浸し、ヒトCD59、ヒトDAF、マウスSca-1、マウスThy1.2、あるいはマウスE-カドヘリンに対するビオチン共役抗体を用いて染色し、次にフィコエリトリン共役ストレプトアビシン (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo) を用いて染色した。

【0029】

また、プリオントンパク質 (PrP) の遊離活性は、ヒト胎児由来線維芽細胞 (HEK293細胞) および抗ヒトプリオントンモノクローナル抗体3F4 (Signet Laboratories, USA) を使用し、前記と同様に染色した。

【0030】

染色した細胞をFACScanセルソーターに供した。ソートされた細胞の生存度を、FSCおよびSSCチャンネルにより評価した。F9細胞内で発現したEGFP-GPIは直接検出した。各試料の平均吸光度は、ACE(-)の試料を1.0として評価した。切断放出%は、図6の説明に示す方法で計算した。分析は少なくとも4回行い、事実上同一の結果が得られた。

1.9.

2. 結果と考察

2.1. 遺伝子導入マウスとそのGPIタンパク質

図1は、EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣の蛍光シグナルを撮影した写真像である。生殖細胞 (Gc) におけるEGFP-GPIの発現は第2系統 (Line 2) に見られたが、第1 (示さず) および第3系統には見られなかった。

【0031】

図2は、遺伝子導入動物の精巣におけるEGFP-GPIタンパク質の溶解度を解析した結果である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンブロッティングに供した。EGFP-GPIが界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第2系統の精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln. 2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln. 2, Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。

2.2. GPIアンカータンパク質放出因子の特定

EGFP-GPI遺伝子導入マウスを用いて、GPIアンカー膜結合型タンパク質放出因子の同定を行い、目的の活性を有する100kDaタンパク質を精製した。すなわち、マウス精巣に由来する生殖細胞の膜リッチ分画を1% Triton X-100を含む緩衝液中で可溶化し、遠心分離を行って上清を取り、クロマトグラフィーによる分画に供した。溶出分画に対してPLAP変換アッセイを行い、その最大値を表1に示す。なお、全ての反応はPI-PLC (1.0U/ml) 処理を付随して行い、その値を最大反応として定義した。図3は、銀染色によるこの100kDaタンパク質の単一バンドを示す。

【0032】

【表1】

カラム	容積	総タンパク質	総活性	比活性	精製率
S-100 sup.	393ml	19100mg	336160 単位 (U*)	180/mg タンパク質	1.0
DEAE- セルロース	8	228	14410	63	3.5
フェニル セファロース	8	212	17596	83	4.6
Con-A- セファロース	1	6	6100	1017	56.5
TSK gel 3000SW	1	1	2500	2500	138.9

*Unit=試料の計数値-背景の計数値/PI-PLCの計数値-背景の計数値

この精製タンパク質は、プロテオミクス分析によりACEであることを確認した

【0033】

さらにこの精製タンパク質活性を、組換えACEおよび市販品ACEと比較した。すなわち、組換えタンパク質および市販品ACEはPLAPを水溶性形態に変換するかを確かめるため、部分精製したPLAPを、精製組換えACE (rACE) または市販製品 (ACE-S) と反応させた。TritonX-114による分配後、水溶性相の一部をSDS-PAGEに供し、PLAPを免疫プロッティングにより検出した。結果は図4に示した通りである。可溶性PLAPに相当するバンドはPI-PLC処理を行った試料よりわずかに小さいが、rACEおよびACE-S処理サンプルの両方に見ることができる。

【0034】

また、ACE反応の用量依存性を。部分精製したPLAPを様々な濃度のACE-Sと反応させ、水溶相のPLAP活性を測定した。結果は図5に示したとおりである。この図5に示したとおり、市販品ACEにおいてもその活性は用量依存的であり、しかもこの活性は特異的なACE阻害剤であるカプトプリルによって阻害された。

2.3. GPIアンカー型タンパク質に対するACEの作用

ACEを用いて生細胞を直接処理し、FACSを用いて細胞表面の各種GPIアンカー型タンパク質の状態を調査した。まずCD59および解離促進因子 (DAF) の2種類のGPIアンカー型タンパク質のHeLa細胞上における発現を分析した。すなわち、HeLa

細胞をフィリピン前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/mlのACE-Sまたは2.8U/mlのPI-PLCを用いて処理し、細胞表面のCD59とDAFの発現をFACS分析により調査した。結果は図6（左）に示したとおりであり、両タンパク質の表面発現は減少した。この結果から、ACE処理された細胞ではGPIアンカー型タンパク質であるCD59およびDAFが細胞膜上から切断放出されることが確認された。さらに、この切断放出（shedding）活性は、コレステロールプロッキング剤であるフィリピン（filipin）を用いて膜脂質ラフトを分裂させた場合により明確化し（図6右）、用量依存的であり（図7）、またカプトプリルによる阻害された（図8）。

【0035】

さらに、他のGPIアンカータンパク質に対するACEの活性をF9細胞において解析した。すなわち、フィリピン前処理（右）または非処理（左）条件下で、EGFP-GPIをトランスフェクションしたF9細胞を1.0U/mlのACE-Sにより処理し、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1およびE-カドヘリンの細胞表面発現をFACS分析により調べた。結果は図9に示したとおりである。フィリピン処理後にはGPIアンカータンパク質の発現は減少していたが、膜貫通型E-カドヘリンは減少しなかった。以上の結果から、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1等のGPIアンカータンパク質も、細胞のACE処理によって同様に切断放出されることが確認された。

【0036】

さらに、ACE-Sによるプリオントンパク質の遊離活性は、図10、11に示したとおりである。HEK293細胞に結合したプリオントンパク質は、ACE-S（1.0U/ml）を処理することによって、平均37%が細胞膜から遊離することが確認された。

【0037】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって、プリオントンパク質、炎症性疾患、細菌感染性疾患等を効果的に予防または治療することができる薬剤が提供される。

【0038】

【配列表】

<110> Kondoh, Gen

<120> ACE containing drug

<130> NP02405-YS

<160> 2

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

TGAATTCCAC CATGGGCCAA GGTTGGGCTA CTCCAGG

37

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

GAATTCGTCA CTTATCATCA TCATCCTTAT AATCCTGCTG TGGCTCCAGG TACAGGC

57

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣における蛍光局在化を観察した顕微鏡像である。EGFP-GPIの生殖細胞 (Gc) 発現は第2系統 (Lane 2) マウスに見られたが、第1 (示さず) および第3系統マウスには見られなかった。Lyはライディヒ細胞。倍率は200倍。

【図 2】

EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣におけるEGFP-GPIタンパク質の溶解度を調べた電気泳動像である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンプロット解析した。EGFP-GPIが界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第2系統マウスの精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln. 2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln. 2, Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。F9はF9トランスフェクタント、NTgは対照としての非トランスジェニックである。

【図 3】

GPIアンカータンパク質遊離因子としてのACEを同定した電気泳動像であり、ACEは銀染色による100kDaの単一バンドとして検出された。

【図 4】

部分精製したPLAPを、精製した組換えACE (rACE) または市販製品 (ACE-S) と反応させ、TritonX-114による分配後、水溶性相の一部をSDS-PAGEに供し、PLAPを免疫プロッティングにより検出した結果である。可溶性PLAPに相当するバンドはPI-PLC処理を行った試料よりわずかに小さいが、rACEおよびACE-S処理サンプルの両方に見ることができる。Inputは反応の基質である。

【図 5】

ACE反応の用量依存性を測定した結果である。部分精製したPLAPを様々な濃度のACE-Sと反応させ、水溶相のPLAP活性を測定した。値は平均値±SD、n=3である。0 mU/mlを対照とした。student's t検定による有意差水準は、* : P<0.01、**

：p<0.05である。反応はカプトプリルにより阻害された（下部）。

【図6】

HeLa細胞をfilipin前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/mlのACS-Sまたは2.8U/mlのPI-PLCを用いて処理し、細胞表面のCD59およびDAFの発現をFACS分析した結果である。ACE処理によってタンパク質の発現は減少したが（細胞数の左シフト）、その程度は異なっていた（CD59は66%、filipin処理後のDAFは58%）。aはACE(-)、bはACE(+)、cはPI-PLC処理を行ったもの。各ラインの数値は中央値（Mean）である。なお、遊離%は、それぞれの細胞集団ごとの平均蛍光度を用いて次のように算出した：

$$\text{遊離\%} = \text{ACE}(-) - \text{ACE}(+) / \text{ACE}(-) - \text{PI-PLC} \times 100$$

PI-PLC処理を行った母集団の平均吸光度を最大遊離、ACE(-)の同値を遊離無しと定義した。

【図7】

filipin処理を行ったHeLa細胞を様々な濃度のACE-S存在下でインキュベートし、CD59の細胞表面発現をFACS分析し、遊離%を算出した結果である。値は平均値±SD、n=3である。0 U/mlを対照とした。student's t検定による有意差水準は、*：P<0.005、**：p<0.01である。

【図8】

filipin処理したHeLa細胞を、表示されたカプトプリル用量の存在下、 10^{-7} MのACEペプチドに相当する0.2U/mlのACE-Sと共にインキュベートし、CD59の細胞表面発現をFACS分析した結果である。値は平均値±SD、n=3である。カプトリル0 Mを対照とした。student's t検定による有意差水準は、*：P<0.01、**：p<0.05である。

【図9】

filipin前処理（右）または非処理（左）条件下で、EGFP-GPIをトランスフェクションしたF9細胞を1.0 U/mlのACE-Sにより処理し、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1およびE-カドヘリンの細胞表面発現をFACS分析した結果である。filipin処理後にはGPIアンカータンパク質の発現は減少していたが、膜貫通型E-カドヘリンは減少していないことが分かり（細胞集団の左シフト）、またそれらの程度は異なる

っていた（遊離%：EGFP-GPIは53%、Sca-1は67%、Thy-1は34%）。各ラインの説明は図6と同様である。

【図10】

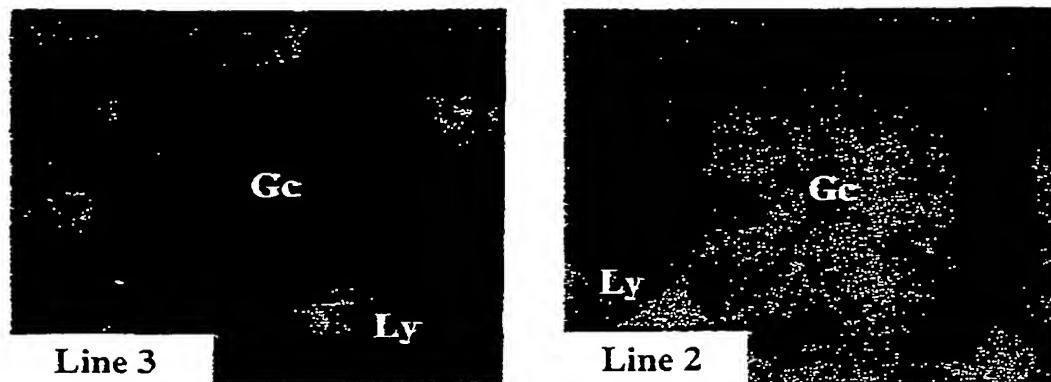
上図は、プリオントンパク質（PrP）を結合したHEK293細胞を1.0 U/mlのACE-Sにより処理し、プリオントンパク質の遊離をFACS分析した結果である。下図は、対照としてCD59の遊離を分析した結果である。

【図11】

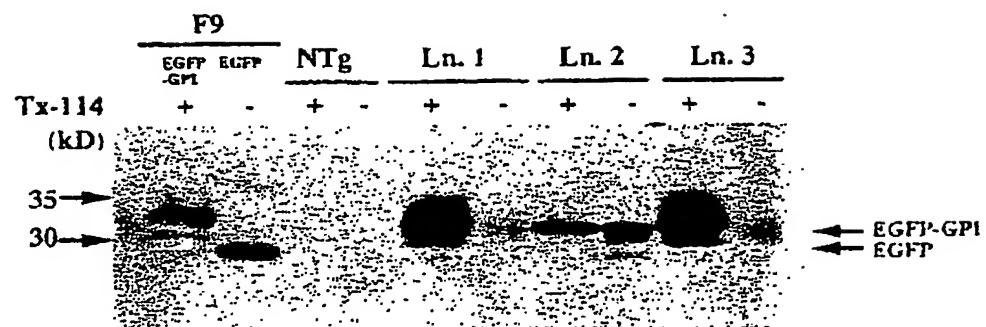
図6、図9および図10の結果を要約したグラフである。

【書類名】 図面

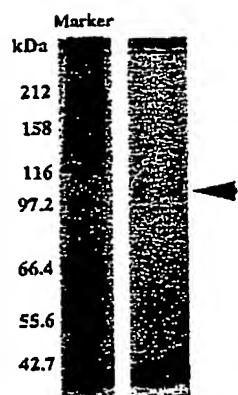
【図 1】



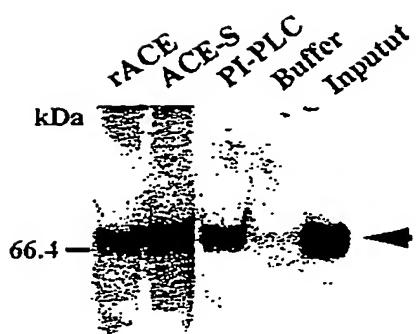
【図 2】



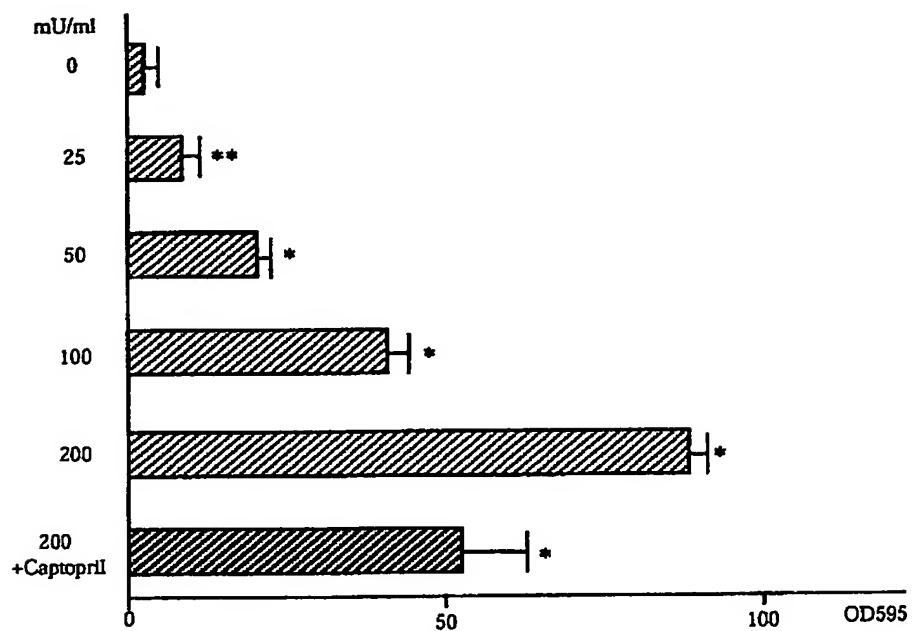
【図 3】



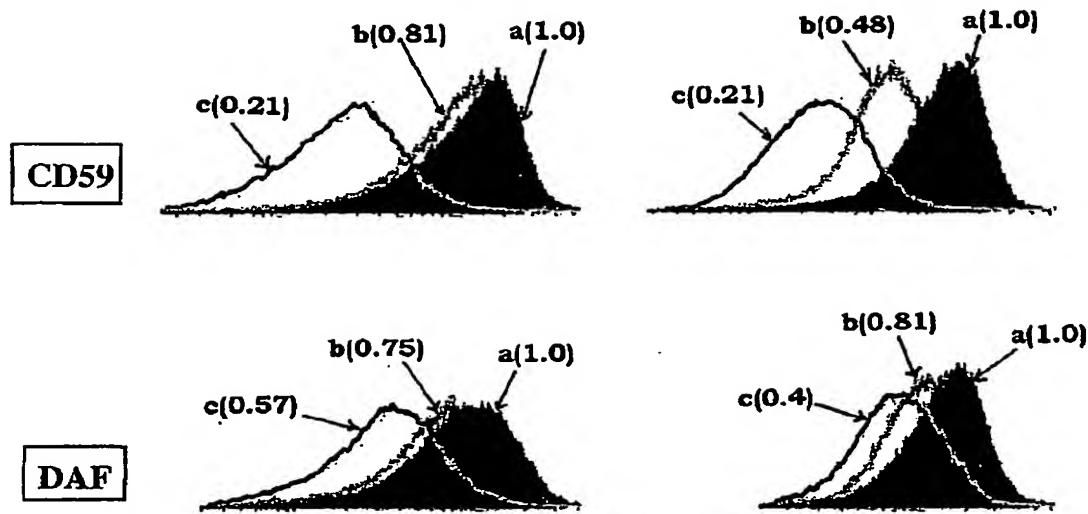
【図4】



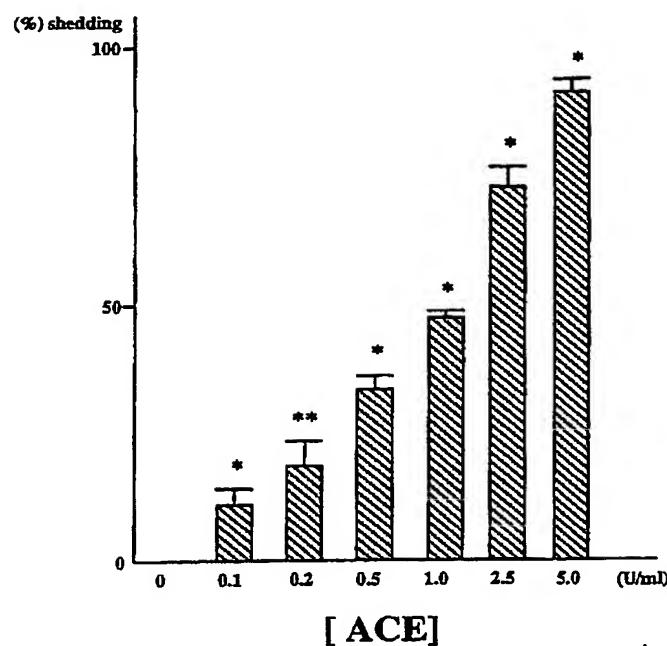
【図5】



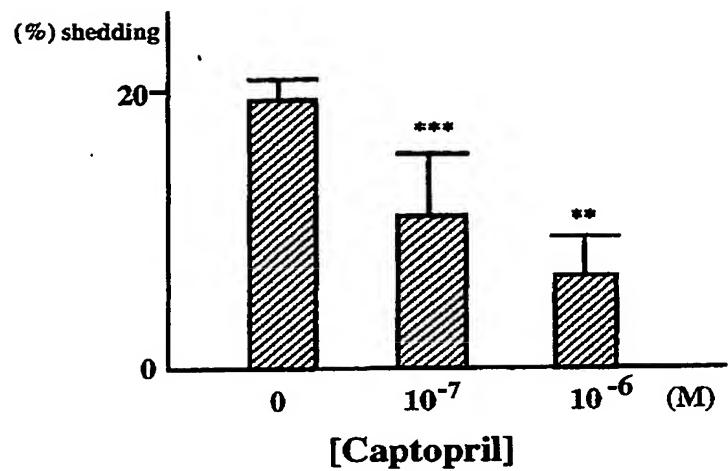
【図6】



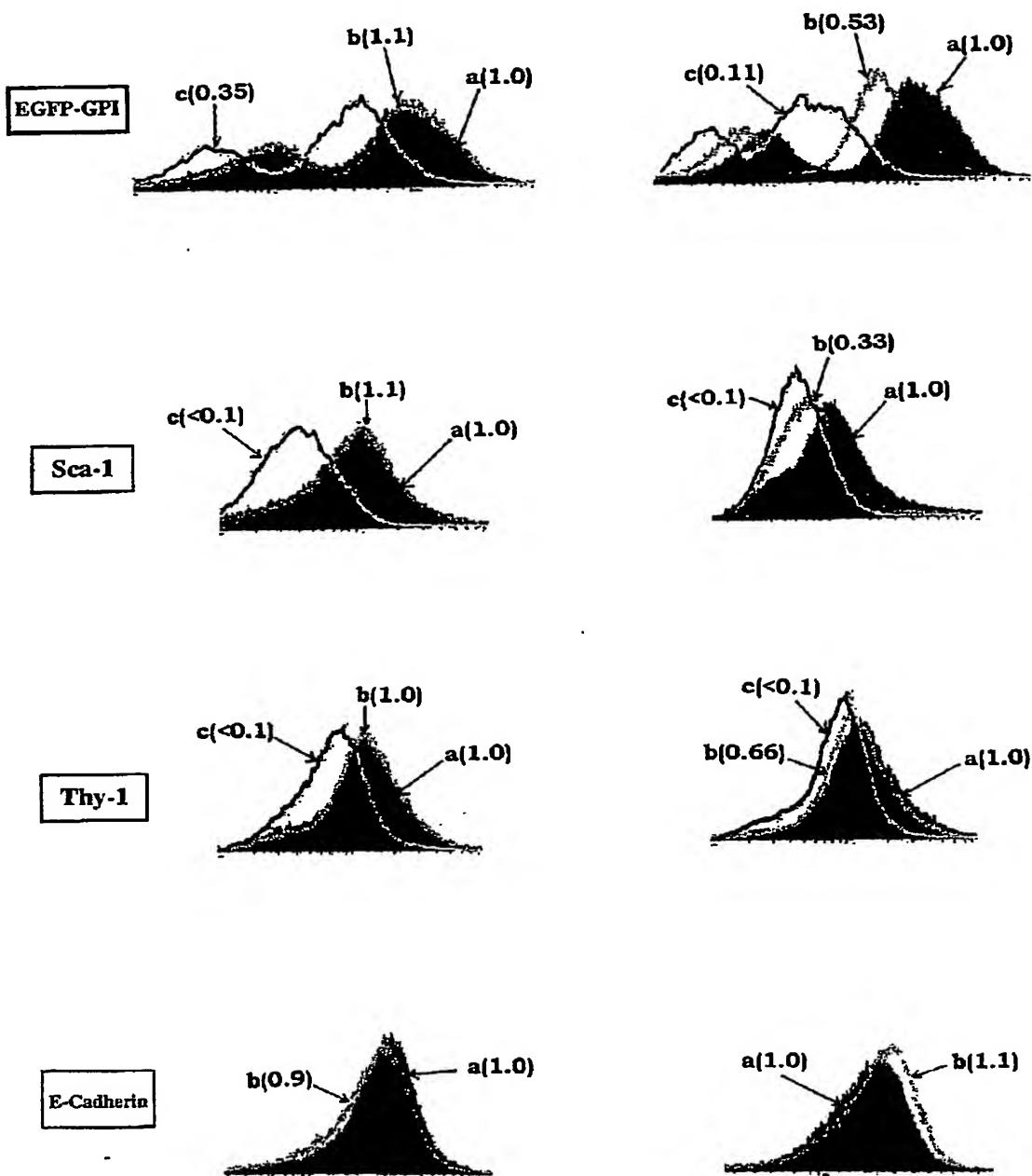
【図7】



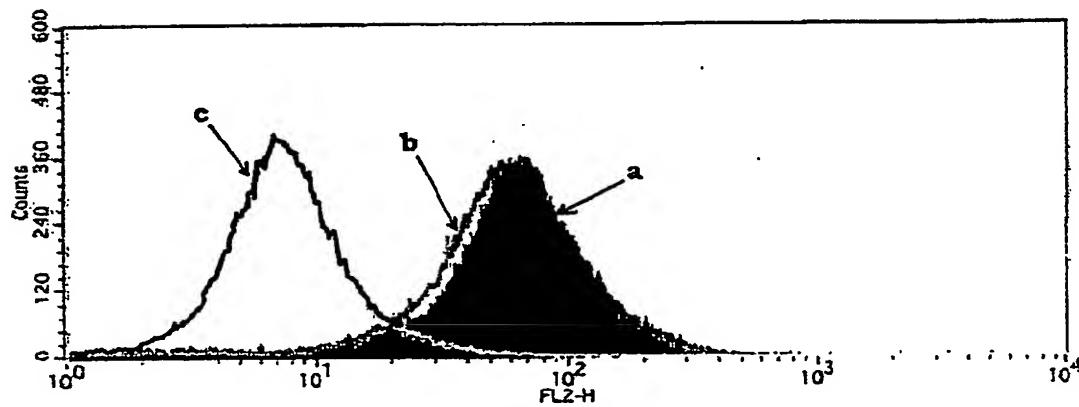
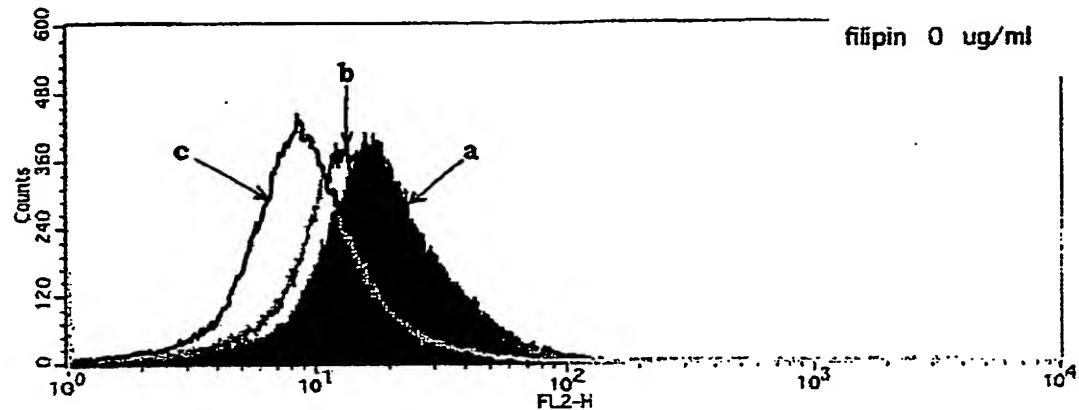
【図 8】



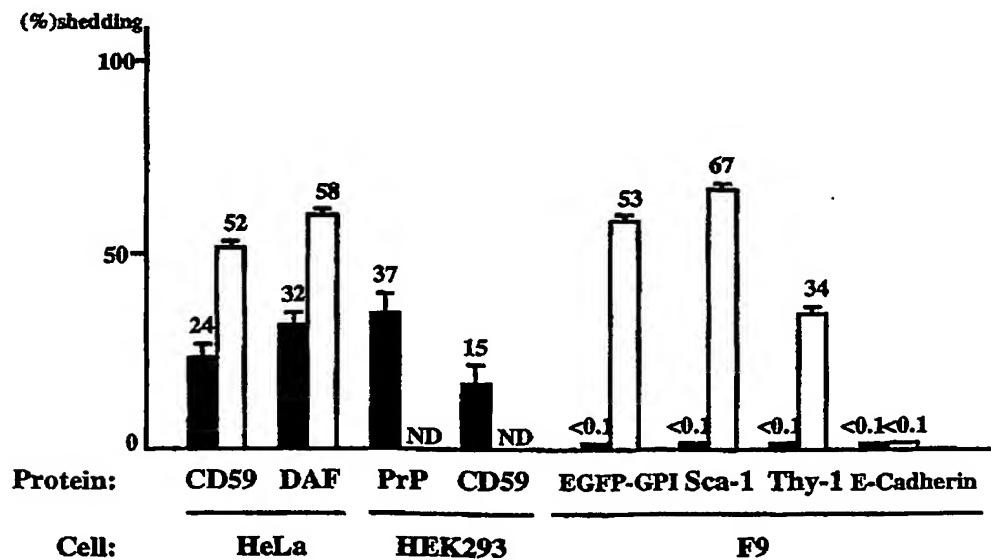
【図9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 有害なGPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによつて各種疾患を予防または治療するための新規薬剤を提供する。

【解決手段】 アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする、プリオント性疾患または細菌感染疾患等の予防または治療用薬剤。

【選択図】 なし

特願2002-314078

出願人履歴情報

識別番号 [502392249]

1. 変更年月日 2002年10月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地
氏 名 近藤 玄